

①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①② **Offenlegungsschrift**
①⑩ **DE 196 02 300 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
C 07 H 21/00
C 07 H 1/06
C 12 Q 1/68
C 07 K 14/435

②① Aktenzeichen: 196 02 300.9
②② Anmeldetag: 23. 1. 96
②③ Offenlegungstag: 24. 7. 97

DE 196 02 300 A 1

⑦① Anmelder:
Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie
(EMBL), 69117 Heidelberg, DE

⑦④ Vertreter:
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

⑦② Erfinder:
Becker, Peter B., 69123 Heidelberg, DE;
Sandatzopoulos, Raphael, 69126 Heidelberg, DE

⑤④ Verfahren zur Immobilisierung von Biopolymeren

- ⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung von Biopolymeren an einer Festphase, wobei man
- (a) ein mit einem ersten Partner eines spezifischen Bindepaares gekoppeltes Biopolymer in einer flüssigen Phase bereitstellt und
 - (b) die flüssige Phase mit einer Festphase unter Bedingungen inkubiert, die zu einer Immobilisierung des Biopolymers auf der Festphase führen, wobei die Festphase den zweiten Partner des spezifischen Bindepaares an ihrer Oberfläche gebunden enthält und die Immobilisierung durch Wechselwirkung der beiden Partner des spezifischen Bindepaares erfolgt,
- dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubation in Gegenwart eines in der flüssigen Phase löslichen polymeren Immobilisierungsaktivators erfolgt.

DE 196 02 300 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung von Biopolymeren an einer Festphase.

Auf dem Gebiet der Molekularbiologie und Biochemie hat die Festphasentechnologie in letzter Zeit große Bedeutung gewonnen. Im allgemeinen beschreibt dieser Ausdruck biochemische Reaktionen, bei denen ein Reaktionspartner an einen festen Träger gekoppelt ist, anstatt frei in Lösung vorzuliegen. Bei Reaktionen, in denen Biopolymere, wie etwa DNA, als Substrat oder Reaktionspartner beteiligt sind, können die Moleküle des Biopolymers auf einfache Weise an verschiedene Oberflächen, z. B. Beads, Gefäßen und Chips aus unterschiedlichen Materialien immobilisiert werden. Durch eine solche Immobilisierungsprozedur können definierte Biopolymere aus komplexen Probengemischen aufgereinigt werden. Die Immobilisierung erleichtert auch Untersuchungen der immobilisierten Biopolymere oder von Substanzen, die mit den immobilisierten Biopolymeren wechselwirken, wie etwa Proteine oder Nucleinsäuren. Derartige Substanzen können aufgrund ihrer Wechselwirkung mit den immobilisierten Biopolymeren isoliert werden. Beispiele von wechselwirkenden Substanzen umfassen z. B. DNA-Bindeproteine, die lebenswichtige Vorgänge in der Zelle regulieren, z. B. Transkriptionsfaktoren.

Immobilisierte DNA kann auch in mehrstufigen experimentellen Protokollen eingesetzt werden, wobei die Ziel-DNA einer Abfolge von mehreren verschiedenen Reaktionsschritten ausgesetzt wird. Ein wichtiges Beispiel einer solchen Abfolge von Reaktionsschritten ist die Bestimmung einer Nucleotidsequenz: die Festphasentechnologie war der Schlüssel zur Entwicklung automatisierter Sequenzierungsprotokolle und -geräte.

Eine Anzahl von Biotechnologiefirmen vertreibt Systeme, welche die Immobilisierung von DNA auf festen Oberflächen ermöglichen. Zur Immobilisierung werden die DNA-Moleküle derart derivatisiert, daß sie chemische Gruppen tragen, die als Liganden für geeignete Rezeptoren auf den zu beschichtenden Oberflächen dienen können. Als Ligand/Rezeptor-Bindepaar werden am häufigsten Biotin und Avidin bzw. Streptavidin (1) verwendet. Jedoch auch andere Liganden, beispielsweise solche, die eine hochaffine Bindung mit einem monoklonalen Antikörper eingehen können, wie etwa Digoxigenin (2) können eingesetzt werden.

Die Immobilisierung von DNA hat weit verbreitete Anwendung in der Grundlagenforschung, der klinischen Diagnostik und der Biotechnologie gefunden. Anwendungen in der Grundlagenforschung beinhalten beispielsweise die Aufreinigung von DNA aus komplexen Probengemischen (3, 4), die Entwicklung von Strategien zur Klonierung von Genen (5–10), die Charakterisierung von Protein/DNA-Wechselwirkungen (11–13), die Reinigung von DNA-Bindeproteinen und Proteinkomplexen aus Rohextrakten (14–16) sowie Untersuchungen über die Transkription (17, 13, 18) und die Verpackung von DNA in Chromatin (18). DNA kann schließlich auch zusammen mit assoziierten Proteinen, z. B. wie sie in Form von Chromatin in den Kernen höherer eukaryontischer Zellen vorkommt, immobilisiert und zur Untersuchung zellbiologischer Prozesse, wie etwa der Bildung von mitotischen Spindeln, verwendet werden (19).

Bei vielen dieser Anwendungen wird die DNA auf kleinen Partikeln aus unterschiedlichen Materialien immobilisiert, insbesondere auf paramagnetischen Beads,

die in einem Magnetfeld schnell und einfach konzentriert werden können. In jüngster Zeit wird zur Untersuchung von immobilisierter DNA auch Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie eingesetzt, wobei als Festphase ein kleiner Sensorchip verwendet wird, auf dem DNA über eine Streptavidin/Biotin-Wechselwirkung immobilisiert ist (20–22).

Die bedeutendste Anwendung für immobilisierte DNA ist die automatisierte Sequenzbestimmung. Der Fortschritt aller internationalen Sequenzierungsprojekte, wie etwa dem humanen Genomprojekt, beruht auf Sequenzierungsautomaten, in denen eine auf paramagnetischen Beads immobilisierte Ziel-DNA analysiert wird (23–25). Außerdem ist die routinemäßige Sequenzierung von Nucleinsäuren auch ein wichtiges Instrument für die klinische Diagnostik, die HLA-Typisierung sowie für forensische oder populationsgenetische Untersuchungen geworden (vgl. (26) sowie die ungefähr darin zitierten 80 Referenzen).

Die Ausbeute der DNA-Immobilisierung auf Oberflächen nimmt mit steigender Länge von DNA-Molekülen drastisch ab. Während biotinylierte einzelsträngige DNA mit einer Länge von 20–30 Nucleotiden in einer Kapazität von 150–200 pmol pro mg von kommerziell erhältlichen Streptavidin-beschichteten Microbeads bindet, findet man bei einer DNA-Länge von 300 Nucleotiden nur noch eine Kapazität von ca. 40 pmol pro mg Beads. Bei einer DNA mit einer Länge von 1000–4000 Nucleotiden verringert sich die Kapazität weiter auf ca. 10–30 pmol pro mg Beads.

Eine der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, ein neues Verfahren zur Immobilisierung von Biopolymeren, insbesondere Nucleinsäuren, an einer Festphase bereitzustellen, bei dem die Immobilisierungseffizienz oder/und -geschwindigkeit insbesondere längerer DNA-Moleküle gegenüber den Verfahren des Standes der Technik verbessert ist. Eine weitere der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand in der Bereitstellung von immobilisierten Nucleinsäuren, die unter verbesserter Ausnutzung der Kapazität von Festphasen in höheren Konzentrationen an eine Festphase als im Stand der Technik bekannt gebunden sind.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Immobilisierung von Biopolymeren an einer Festphase, wobei man

(a) ein mit einem ersten Partner eines spezifischen Bindepaares gekoppeltes Biopolymer in einer flüssigen Phase bereitstellt und

(b) die flüssige Phase mit einer Festphase unter Bedingungen inkubiert, die zu einer Immobilisierung des Biopolymers auf der Festphase führen, wobei die Festphase den zweiten Partner des spezifischen Bindepaares an ihrer Oberfläche gebunden enthält und die Immobilisierung durch Wechselwirkung der beiden Partner des spezifischen Bindepaares erfolgt,

dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubation in Gegenwart eines in der flüssigen Phase löslichen polymeren Immobilisierungsaktivators erfolgt.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß bei Anwesenheit von wasserlöslichem polymeren Immobilisierungsaktivatoren in einer wirksamen Konzentration die Ausbeute der Immobilisierungsreaktion von Biopolymeren an Festphasen dramatisch gesteigert werden kann. So wurde beispielsweise gefunden, daß die Immo-

bilisierung von DNA-Molekülen mit einer Länge von 6,2 kb um mindestens 1–2 Größenordnungen verbessert werden kann. Außerdem konnten durch das erfindungsgemäße Verfahren auch noch wesentlich längere DNA-Moleküle, z. B. DNA-Moleküle mit einer Länge von ca. 50 kb immobilisiert werden, was mit konventionellen Methoden bisher nicht möglich war.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren werden Reaktionen verbessert oder überhaupt erst ermöglicht, in denen ein kritischer Parameter entweder eine hohe absolute Menge an immobilisierter DNA einer gegebenen Länge oder/und eine große Länge der immobilisierten DNA ist. Spezifische Beispiele auf dem Gebiet der molekularbiologischen Grundlagenforschung sind Reaktionen, bei denen DNA-bindende Komponenten, wie etwa Proteine oder hybridisierende komplementäre DNA-Stränge gereinigt werden müssen und bei denen die Komplexbildung im wesentlichen von den Konzentrationen der Reaktionspartner abhängt. Die Möglichkeit zur Immobilisierung langer DNA-Moleküle an eine Festphase hat auch große Bedeutung für Strategien zur Klonierung von Genen, bei denen durch die Isolierung von längeren Produkten die Notwendigkeit von erneuten Musterungsschritten entfällt.

Ein weiteres Beispiel für die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens in der Zellbiologie ist die Untersuchung der Bildung mitotischer Spindeln an Chromatin. Diese Bildung mitotischer Spindeln hängt auf kritische Weise von der Höhe der Konzentration von immobilisierter DNA auf einem Partikel ab. Bei diesen Experimenten wird DNA zuerst auf paramagnetischen Beads immobilisiert, dann in einem zellfreien System zu Chromatin verpackt, und das resultierende Chromatin wird schließlich als Substrat für die Spindelbildung verwendet. Bei diesen Experimenten wurde festgestellt, daß Beads, an denen gemäß den Verfahren des Standes der Technik DNA-Moleküle in geringer Konzentration immobilisiert waren, keine signifikante Spindelbildung hervorriefen, während nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Beads mit einer hohen Konzentration an immobilisierter DNA hervorragende Resultate zeigten.

Weiterhin kann durch das erfindungsgemäße Verfahren auch die Wirksamkeit und Geschwindigkeit der DNA-Sequenzierung verbessert werden. Die Immobilisierung ausreichender Mengen an DNA-Fragmenten, die signifikant länger als die bisher verwendeten sind, ermöglicht es, aus jeder einzelnen Sequenzierungsreaktion erheblich mehr Informationen zu erhalten. Dies ist ein Faktor, der eine große Bedeutung für gegenwärtige und auch zukünftige Sequenzierungsprojekte haben wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren führt zu einer generellen Verbesserung der Immobilisierung von Biopolymeren. Unter dem Begriff "Biopolymere" sind insbesondere Proteine, z. B. Polypeptide, Glykoproteine, Lipoproteine etc., Kohlenhydrate, z. B. Polysaccharide, Lipopolysaccharide, etc., und Nucleinsäuren zu verstehen. Vorzugsweise ist das Biopolymer eine Nucleinsäure, z. B. eine einzelsträngige oder doppelsträngige DNA oder eine RNA. Besonders bevorzugt ist das Biopolymer eine einzelsträngige oder doppelsträngige DNA.

Obwohl durch das erfindungsgemäße Verfahren die Immobilisierungseffizienz an eine Festphase für Nucleinsäuren mit beliebiger Länge verbessert werden kann, nimmt die Größe der Verbesserung mit steigender Länge der Nucleinsäuren zu. Eine durch das erfindungsgemäße Verfahren zu immobilisierende Nuclein-

säure weist daher vorzugsweise eine Länge von ≥ 100 Nucleotiden, besonders bevorzugt ≥ 1000 Nucleotiden und am meisten bevorzugt ≥ 5000 Nucleotiden auf. Die Obergrenze für die Länge von immobilisierbaren Nucleinsäuren beträgt mindestens ca. 100–150 kb.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren zur Immobilisierung des Biopolymers verwendete Festphase ist nicht kritisch. Vorzugsweise wird die Festphase aus der Gruppe, bestehend aus Beads, Mikrotiterplatten, Reaktionsgefäßen, wie etwa Küvetten, Chips, Sensoroberflächen und Membranen ausgewählt. Besonders bevorzugt sind paramagnetische Mikrobeads, Chips und Sensoroberflächen.

Die Immobilisierung des Biopolymers an der Festphase erfolgt über ein spezifisches Bindepaar, wobei der erste Partner dieses Bindepaars an das Biopolymer gekoppelt und der zweite Partner an der Oberfläche der Festphase gebunden ist. Zwischen den Partnern des Bindepaars besteht vorzugsweise eine hochaffine nicht-kovalente Wechselwirkung, die eine Bindungskonstante von vorzugsweise $\geq 10^7 \text{ M}^{-1}$ aufweist. Beispiele für geeignete Bindepaare sind Biotin/Streptavidin bzw. Avidin, Hapten bzw. Antigen/Antikörper und Kohlenhydrat/Lectin. Besonders bevorzugt ist das Bindepaar Biotin/Streptavidin bzw. Avidin mit einer Bindungskonstante von ca. 10^{15} M^{-1} , wobei man ein biotinyliertes Polymer an einer mit Streptavidin bzw. Avidin beschichteten Festphase immobilisiert. Weiterhin besonders bevorzugt sind auch Hapten-markierte Biopolymere, die an eine mit einem hochaffinen monoklonalen Antikörper oder einem Fragment davon beschichtete Festphase binden können. Beispiele für geeignete Haptene sind Bromdeoxyuridin, Digoxigenin und Fluorescein.

Die Kopplung der Biopolymere mit einem ersten Partner eines spezifischen Bindepaars kann nach an sich bekannten Methoden erfolgen. Zur Markierung von Nucleinsäuren werden beispielsweise biotinylierte oder Hapten-markierte Nucleotide enzymatisch in den Nucleinsäurestrang eingebaut. Polypeptide können beispielsweise durch Kopplung mit einem Biotin- oder Haptenderivat markiert werden, das an funktionelle Gruppen des Polypeptids bindet. Beispiele für geeignete aktivierte Biotin- und Haptenderivate sind Aktivester, z. B. N-Hydroxysuccinimidester, die mit Aminogruppen reagieren, und Maleimidderivate, die mit SH-Gruppen reagieren.

Das wesentliche Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß die Inkubation des zu immobilisierenden Biopolymers mit der Festphase in Gegenwart eines in der flüssigen Phase löslichen polymeren Immobilisierungsaktivators erfolgt. Der Immobilisierungsaktivator ist vorzugsweise ein wasserlösliches Polymer, das aus der Gruppe bestehend aus Polysacchariden, Polysaccharidderivaten, Polyalkoholen, Polypeptiden und Gemischen davon ausgewählt wird. Beispiele für geeignete Polysaccharide oder Polysaccharidderivate sind Glykogen, Amylose, Dextran, Dextransulfat und Ficoll® (ein Kondensat aus Saccharose und Epichlorhydrin), die alleine oder in Kombination verwendet werden können. Beispiele für Polypeptide, die sich als Immobilisierungsaktivator eignen, sind Serumalbumine, wie etwa Rinderserumalbumin, Gelatine, und synthetische geladene Polypeptide, wie etwa Polylysine und Polyglutaminsäure. Diese Polypeptide können sowohl einzeln als auch in Kombination eingesetzt werden. Weiterhin kann der Immobilisierungsaktivator ein Polyalkohol sein und spezifische Beispiele für Polyalkohole sind Polyalkylenoxidpolymere, wie etwa Polyethylen-

glykol, Polypropylenglykol oder Polyethylenpropylen-glykole.

Ein weiteres Beispiel für einen geeigneten Polyalkohol ist Polyvinylalkohol.

Die Immobilisierungsaktivatoren des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in einer Konzentration eingesetzt, die zu einer Verbesserung der Effizienz bzw. der Geschwindigkeit der Immobilisierung von Biopolymeren an der Festphase führt. Bei dieser Polymerkonzentration wird im wäßrigen Reaktionsvolumen die "freie" Wasserkonzentration aufgrund der Anwesenheit der Polymere verringert, wodurch die tatsächliche Konzentration der Reaktionspartner, d. h. der Partner des spezifischen Bindungspaares auf dem Biopolymer und auf der Festphase erhöht wird. Bei zu hohen Polymerkonzentrationen kann in manchen Fällen eine Präzipitation der Biopolymere aus der Lösung erfolgen. Anhand dieser Richtlinien kann der Fachmann auf einfache Weise wirksame Konzentrationen für die jeweils verwendeten löslichen polymeren Immobilisierungsaktivatoren ermitteln.

Bei Verwendung von Polyethylenglykol als Immobilisierungsaktivator, z. B. Polyethylenglykol mit einem Molekulargewicht von 6000–12000, ist eine Konzentration von 3–15% (Gew./Vol.) bei der Immobilisierungsreaktion bevorzugt. Besonders bevorzugt ist die Konzentration 5–12% (Gew./Vol.). Bei Polyvinylalkohol, z. B. Polyvinylalkohol mit einem Molekulargewicht von 10000–100000, insbesondere von 30000–70000, ist eine Konzentration von 1–5% (Gew./Vol.) bevorzugt und eine Konzentration von 2–4% (Gew./Vol.) besonders bevorzugt.

Die Temperatur und Dauer der Inkubation des Biopolymers mit der Festphase können beim erfindungsgemäßen Verfahren in weiten Bereichen variiert werden. Üblicherweise werden Inkubationstemperatur und -dauer so gewählt, daß eine größtmögliche Immobilisierung stattfinden kann. Typische Inkubationstemperaturen sind 0°C bis 50°C, insbesondere Raumtemperatur bis 37°C. Die typische Inkubationsdauer ist 10 min. bis 10 h.

Zur effizienten Immobilisierung von Nucleinsäuren wie etwa DNA, die eine negative Ladung tragen, ist eine Neutralisierung dieser Ladung zweckmäßig. Hierzu können monovalente Kationen verwendet werden, aber es ist durchaus möglich, auch di- oder polyvalente Kationen wie etwa Spermidin oder Spermin zu verwenden. Die Anwesenheit solcher Kationen ist insbesondere bei der Immobilisierung von Nucleinsäuren bevorzugt. Bei anderen Biopolymeren, bei denen eine Ladungsneutralisierung nicht erforderlich ist, können diese Kationen auch fehlen.

Bei der Immobilisierung von Biopolymeren, die eine Ladungsneutralisation erfordern, ist der Zusatz von Salzen mit monovalenten Kationen bevorzugt. Die Anwesenheit solcher Salze bei der Immobilisierung von Nucleinsäuren ist bereits im Stand der Technik bekannt, wobei üblicherweise eine sehr hohe Salzkonzentration von ca. 2 M verwendet wird. Beim erfindungsgemäßen Verfahren hat es sich in vielen Fällen als günstig erwiesen, eine geringere Salzkonzentration, z. B. im Bereich von 0,5 bis 1,5 M zu wählen. Gute Ergebnisse bei der Immobilisierung von DNA wurden bei einer Konzentration von ca. 1 M an monovalenten Kationen erreicht. Geeignete monovalente Kationen sind Alkalimetallionen und Ammoniumionen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Reagenzienkit zur Immobilisierung von Biopoly-

meren, umfassend

- (a) Mittel zur Kopplung eines ersten Partners eines spezifischen Bindepaares an ein Biopolymer oder/und ein mit einem ersten Partner eines spezifischen Bindepaares gekoppeltes Biopolymer,
- (b) eine Festphase, die den zweiten Partner des spezifischen Bindepaares an ihrer Oberfläche gebunden enthält und
- (c) einen polymeren Immobilisierungsaktivator.

Die Mittel zur Kopplung eines ersten Partners eines spezifischen Bindepaares an ein Biopolymer sind ein Reagenz, welches den ersten Partner des Bindepaares in einer zur Kopplung an das Biopolymer geeigneten Form enthält, z. B. ein biotinyliertes Nucleotid oder ein Hapten-markiertes Nucleotid, wenn das Biopolymer eine Nucleinsäure ist, oder ein reaktives Biotin- oder Haptenderivat, wenn das Biopolymer ein Protein ist.

Das Biopolymer ist vorzugsweise eine Nucleinsäure, insbesondere eine DNA. Das spezifische Bindepaar ist vorzugsweise Biotin/Avidin bzw. Streptavidin. Die Festphase ist, wie vorstehend definiert, vorzugsweise eine partikelförmige Festphase, z. B. paramagnetische Microbeads, ein Chip oder die Oberfläche eines Sensors.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind lange Nucleinsäuremoleküle, die in sehr hoher Konzentration an einer Festphase immobilisiert und durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich sind. Wie in den folgenden Beispielen gezeigt, können durch das erfindungsgemäße Verfahren Nucleinsäuremoleküle mit einer Länge von 6,2 kb in einer Konzentration von mindestens 100 pmol DNA und Nucleinsäuremoleküle von ca. 50 kb in einer Konzentration von ≥ 1 pmol DNA pro mg Streptavidin-beschichteten Microbeads immobilisiert werden. Derartige Konzentrationen an immobilisierter DNA sind aus dem Stand der Technik nicht bekannt. Bei einer Oberfläche der Microbeads von $3-8 \text{ m}^2/\text{g}$ Beads (entsprechend $30-80 \text{ cm}^2/\text{mg}$ Beads), wie sie vom Hersteller (Dynal) angegeben wird, können durch das erfindungsgemäße Verfahren Nucleinsäuremoleküle mit einer Länge ≥ 5 kb in einer Konzentration von ≥ 3000 bis $8000 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ Oberfläche und Nucleinsäurefragmente mit einer Länge von ca. 50 kb in einer Konzentration von $\geq 30-80 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ Oberfläche immobilisiert werden.

Gemäß vorliegender Erfindung wird somit eine Nucleinsäure, insbesondere einzelsträngige oder doppelsträngige DNA bereitgestellt, die über die nicht-kovalente Wechselwirkung zweier Partner eines spezifischen Bindepaares an einer Festphase immobilisiert ist, wobei der erste Partner des Bindepaares an die Nucleinsäure gekoppelt und der zweite Partner des Bindepaares an die Festphase gebunden ist. In einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung weist die Nucleinsäure eine Länge von mindestens 1 kb, vorzugsweise von 1–10 kb auf und ist in einer Konzentration von mindestens 1000 pmol und vorzugsweise von mindestens 3000 pmol pro cm^2 der Festphasenoberfläche immobilisiert. In einem zweiten Aspekt weist die Nucleinsäure eine Länge von mindestens 5 kb, vorzugsweise von 5–20 kb auf und ist in einer Konzentration von mindestens 300 pmol, vorzugsweise von mindestens 1000 pmol und besonders bevorzugt von mindestens 3000 pmol pro cm^2 der Festphasenoberfläche immobilisiert. In einem dritten Aspekt weist die Nucleinsäure eine Länge von mindestens 10 kb, vorzugsweise von 10–100 kb auf und ist in einer Konzentration von mindestens 30 pmol, vorzugs-

weise von mindestens 100 pmol und besonders bevorzugt von mindestens 300 pmol pro cm² der Festphasenoberfläche immobilisiert.

Vorzugsweise ist bei der erfindungsgemäßen immobilisierten Nucleinsäure der erste Partner des Bindepaares Biotin und der zweite Partner des Bindepaares Avidin oder/und Streptavidin. Die Festphase ist vorzugsweise partikelförmig und umfaßt besonders bevorzugt Microbeads, insbesondere paramagnetische Microbeads mit einer Oberfläche von 0,5 bis 20 m²/g Beads.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung von immobilisierten Nucleinsäuren, die durch ein Verfahren, wie oben beschrieben, hergestellt wurden, oder von erfindungsgemäßen immobilisierten Nucleinsäuren zur Sequenzanalyse oder zur Untersuchung von Nucleinsäure-bindenden Komponenten.

Weiterhin soll die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele sowie Abb. 1 erläutert werden.

Abb. 1 zeigt die Immobilisierung einer biotinylierten Nucleinsäure in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von PVA als Immobilisierungsaktivator.

Beispiel 1

Immobilisierung von Plasmid DNA

Ein linearisiertes Plasmid mit einer Länge von 6,2 kb, das an einem Ende biotinyliert war, wurde zur Immobilisierung verwendet.

Das Plasmid wurde mit Cla I (singuläre Restriktionsschnittstelle im Polylinker) linearisiert und weiterhin mit EcoRI (singuläre Restriktionsschnittstelle im Polylinker) gespalten, wobei ein langes 6,2 kb Fragment und ein sehr kurzes 21 bp Fragment erhalten wurden. Die DNA wurde durch Präzipitation gewonnen und in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 0,1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA)) resuspendiert. Die Fragmente wurden an ihren 3'-Enden mit Klenow DNA-Polymerase und 50 µM Biotin-14-dATP (Gibco, BRL), 200 µM α-S-dTTP, 200 µM α-S-dCTP und 200 µM α-S-dGTP (Pharmacia) aufgefüllt. Das nicht eingebaute Biotin-14-dATP sowie das kleine DNA-Fragment wurden mittels Gelfiltration durch eine Chromaspin TE-100[®]-Säule (Clontech) gemäß den Vorschriften des Herstellers entfernt. Zur Herstellung eines radioaktiv markierten biotinylierten Fragments wurde α[³²P] dCTP bei der Auffüllreaktion zugesetzt. Die radioaktive DNA wurde mit der nicht-radioaktiven DNA in einem Verhältnis von 1 : 3 gemischt. Die Konzentration der biotinylierten DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Ein kleines Aliquot des biotinylierten Fragments wurde vollständig auf einem Überschuß von Streptavidin-beschichteten paramagnetischen Beads (Dynabeads[®] M-280, Dynal, Oslo) immobilisiert, was zeigte, daß alle Fragmente biotinyliert waren.

Immobilisierung

Es wurde die DNA-Bindekapazität der Streptavidin-beschichteten Beads bestimmt.

Hierzu wurden mehrere identische Reaktionsansätze durchgeführt, die eine vorgegebene Menge an DNA (0,5 µg) in Bindepuffer (1 M NaCl, 10 mM Tris pH 8,0, 2 mM EDTA, pH 8,0) in einem Endvolumen von 20 µl enthielten. Um die Wirkung von polymeren Immobilisierungsaktivatoren zu testen, wurden zu einer Serie von Ansätzen 2,5% Polyvinylalkohol (PVA) mit einem

Molekulargewicht von ca. 30000–70000 (Sigma) zugesetzt. Zur Immobilisierung wurden abnehmende Mengen an Streptavidin-beschichteten paramagnetischen Beads (Dynabeads[®], Dynal, Oslo), die gemäß der Vorschrift des Herstellers vorgewaschen waren, jeweils zwei Ansätzen (mit oder ohne PVA) zugesetzt, wobei das Verhältnis von pmol DNA pro Beadoberfläche (1–100 pmol/mg Beads) sukzessiv erhöht wurde. Nach dreistündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Rotator, um die Beads in Suspension zu halten, wurde die Immobilisierungseffizienz überprüft.

Bestimmung der Immobilisierungseffizienz

5 µl des Überstands eines Reaktionsansatzes (mit einer Maximalmenge von 0,5 µg DNA, falls die gesamte DNA in Lösung geblieben ist) wurden durch Agarosegelelektrophorese analysiert (Spur C in Abb. 1). Das Gel wurde getrocknet und die Radioaktivität der Banden mit einem PhosphorImager[®] gemessen. Daraus wurde die nach der Immobilisierung in Lösung verbleibende DNA-Menge und somit die Immobilisierungseffizienz abgeleitet.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abb. 1 dargestellt. Bei allen PVA-enthaltenden Ansätzen konnte im Überstand der Immobilisierungsreaktion keine DNA mehr nachgewiesen werden (Spuren 1–8 in Abb. 1; + PVA). Somit wurde selbst bei der geringsten Menge an Beads eine vollständige Immobilisierung erreicht.

Das in dieser Versuchsserie getestete Maximalverhältnis war 100 pmol DNA/mg Beads. Folglich können in Gegenwart von 2,5% PVA mindestens 100 pmol DNA (6,2 kb) pro mg Beads (und vermutlich sogar noch mehr) immobilisiert werden. Im Gegensatz dazu war in Abwesenheit von PVA die maximale Kapazität der Beads weniger als 2 pmol DNA/mg Beads (Spuren 9–16 in Abb. 1; – PVA).

Beispiel 2

Immobilisierung von Lambda-DNA

Es wurde auch getestet, ob sehr lange DNA (z. B. DNA des Phagen Lambda mit 48,5 kb) auf Beads immobilisiert werden kann und ob polymere Immobilisierungsaktivatoren, nämlich PVA und Polyethylenglykol (PEG), die Immobilisierungseffizienz verbessern können.

Lambda-DNA wurde hierfür zunächst für 5 min. bei 72°C inkubiert, um Konkamere zu dissoziieren. Die kohäsiven Enden wurden mit Vent Polymerase[®] (US Biolabs) und Deoxynucleotiden (50 µM Biotin-16-dUTP; 200 µM α-S-dATP, 200 µM α-S-dCTP, 200 µM α-S-dGTP) für 30 min. bei 72°C aufgefüllt. Die DNA wurde präzipitiert und zur Abtrennung freier Nucleotide gewaschen. Anschließend wurde sie in Wasser resuspendiert und die Konzentration bestimmt.

Die Immobilisierungsreaktionen wurden wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt eine konstante Menge an DNA in Bindepuffer entweder ohne Polymere oder mit Zusatz von 2,5% PVA (Molekulargewicht ca. 30–70 000; Sigma) oder 8–12% PEG (Molekulargewicht ca. 8000; Sigma). Die unter diesen Bedingungen immobilisierte DNA-Menge wurde durch Agarosegelelektrophorese von DNA im Überstand der Immobilisierungsreaktion und Anfärbung durch Ethidiumbromid bestimmt.

Bei Zusatz von 2,5% PVA oder 8–12% PEG war die

Immobilisierungseffizienz größer als 1 pmol DNA/mg Beads, während in Abwesenheit von PVA oder PEG keine nachweisbare Immobilisierung gefunden wurde.

Liste von Literaturzitaten

1. György, P., et al. (1941) Egg-white injury as the result of nonabsorption or inactivation of biotin. *Science*, 93: 477-478.
2. Boehringer (1994) Manetpartikel, anti-Digoxigenin- oder Streptavidin gekoppelt. *Biochemica*, 93: 21.
3. Sandaltzopoulos, R. and E. Bonte (1995) Elimination of background in footprinting analysis by template selection. *BioTechniques*, 18: 775-776.
4. Fry, G., et al. (1992) A new approach of template purification for sequencing applications using paramagnetic particles. *BioTechniques*, 13: 124-131.
5. Raineri, L. C. Moron, and H.P. Senn (1991) Improved efficiency for singlestranded PCR by creating a reusable pool of first strand cDNA coupled to a solid support. *Nucleic Acids Res.*, 19: 4010.
6. Sharma, P., A. Lönneburg, and P. Stougaard (1993) PCR-based construction of subtractive cDNA library using magnetic beads. *BioTechniques*, 15: 610-611.
7. Lee, Y.-H. and V.D. Vacquie (1992) Reusable cDNA libraries coupled to magnetic beads. *Anal. Biochem.*, 206: 206-207.
8. Lambert, K.N. and V.M. Williamson (1993) cDNA library construction from small amounts of RNA using paramagnetic beads. *Nucleic Acids Res.*, 21: 775-776.
9. Aasheim, H.-C., et al. (1994) A simple subtraction method for the isolation of cell-specific genes using magnetic monodisperse polymer particles. *BioTechniques*, 16: 716-721.
10. Rodriguez, I.R. and G.J. Chader (1992) A novel method for the isolation of tissue-specific genes. *Nucleic Acids Res.*, 20: 3528.
11. Sandaltzopoulos, R. and P.B. Becker (1994) Solid phase footprinting: Quick and versatile. *Nucleic Acids Res.*, 22: 1511-1512.
12. Sandaltzopoulos, R., et al. (1994) Nonradioactive, solid-phase DNase I footprints analyzed on an A.L.F. DNA sequencer. *BioTechniques*, 17: 474-477.
13. Peterson, S.R., et al. (1992) DNA binding provides a signal for phosphorylation of the RNA polymerase II heptapeptide repeats. *Genes Dev.*, 6: 426-438.
14. Gabrielsen, O.S. and J. Huet (1993) Magnetic affinity purification of yeast transcription factor. *Meth. Enzymology*, 218: 508-525.
15. Ren, L., H. Chen, and E.A. Sternberg (1994) Tethered bandshift assay and affinity purification of a new DNA binding protein. *BioTechniques*, 16: 852-855.
16. Ozyhar, A., et al. (1992) Magnetic DNA affinity purification of ecysterone receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 43: 629-634.
17. Choy, B. and M.R. Green (1993) Eukaryotic activators function during multiple steps of preinitiation complex assembly. *Nature*, 366: 531-536.
18. Sandaltzopoulos, R., T. Blank, and P.B. Becker (1994) Transcriptional repression by nucleosomes but not H1 in reconstituted preblastoderm *Drosophila* chromatin. *EMBO J.*, 13: 373-379.

19. Heald, R. et al. (1996) manuscript in preparation.
20. Bondeson, K., et al. (1993) Lactose-repressor-operator DNA interactions: kinetic analysis by a surface plasmon resonance biosensor. *Anal. Biochem.*, 214: 245-251.
21. Nilsson, P., et al. (1995) Real-time monitoring of DNA manipulations using biosensor technology. *Anal. Biochem.*, 224: 400-408.
22. Parsons, I.D., et al. (1995) Probing the molecular mechanism of action of co-repressor in the *E. Coli* methionine repressor-operator complex using surface plasmon resonance (SPR). *Nucleic Acids Res.*, 23: 211-216.
23. Hultman, T., et al. (1989) Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support. *Nucleic Acids Res.*, 17: 4937-4946.
24. Hultman, T., et al. (1991) Bidirectional solid phase sequencing of in vitro amplified plasmid DNA. *BioTechniques*, 10: 84-93.
25. Ansorge, W., et al. (1993) Sequencing reactions for ALF (EMBL) automated DNA sequencer. *Meth. Mol. Biol.*, 23: 317.
26. Dynal (1995) *Biomagnetic Techniques in Molecular Biology*. 2nd Edition.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Immobilisierung von Biopolymeren an einer Festphase, wobei man
 - (a) ein mit einem ersten Partner eines spezifischen Bindepaares gekoppeltes Biopolymer in einer flüssigen Phase bereitstellt und
 - (b) die flüssige Phase mit einer Festphase unter Bedingungen inkubiert, die zu einer Immobilisierung des Biopolymers auf der Festphase führen, wobei die Festphase den zweiten Partner des spezifischen Bindepaares an ihrer Oberfläche gebunden enthält und die Immobilisierung durch Wechselwirkung der beiden Partner des spezifischen Bindepaares erfolgt,
 dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubation in Gegenwart eines in der flüssigen Phase löslichen polymeren Immobilisierungsaktivators erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Biopolymer aus der Gruppe bestehend aus Polypeptiden, Glykoproteinen, Lipoproteinen, Kohlehydraten und Nucleinsäuren, ausgewählt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Biopolymer eine Nucleinsäure, insbesondere eine DNA umfaßt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäure eine Länge von ≥ 100 Nucleotiden aufweist.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäure eine Länge von ≥ 1000 Nucleotiden aufweist.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäure eine Länge von ≥ 5000 Nucleotiden aufweist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dpa durch gekennzeichnet, daß die Festphase aus der Gruppe bestehend aus Beads, Mikrotriterplatten, Reaktionsgefäßen, Chips, Sensoroberflächen und Membranen ausgewählt wird.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Binde-

paar ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Biotin/Streptavidin bzw. Avidin, Hapten bzw. Antigen/Antikörper und Kohlenhydrat/Lectin.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man ein biotinyliertes Biopolymer an einer mit Streptavidin bzw. Avidin beschichteten Festphase immobilisiert.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Immobilisierungsaktivator ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Polysacchariden, Polysaccharidderivaten, Polyalkoholen, Polypeptiden und Gemischen davon.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Immobilisierungsaktivator ein Polysaccharid oder Polysaccharidderivat verwendet.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man als Immobilisierungsaktivator Glykogen, Amylose, Dextran, Dextransulfat oder/und Ficoll® verwendet.

13. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Immobilisierungsaktivator ein Polypeptid verwendet.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man als Immobilisierungsaktivator ein Serumalbumin, Gelatine, Polylysin oder/und Polyglutaminsäure verwendet.

15. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man als Immobilisierungsaktivator einen Polyalkohol verwendet.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man als Immobilisierungsaktivator ein Polyalkylenoxid oder/und Polyvinylalkohol verwendet.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man als Immobilisierungsaktivator Polyethylenglykol in einer Konzentration von 3–15% (Gew./Vol.) verwendet.

18. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man als Immobilisierungsaktivator Polyvinylalkohol in einer Konzentration von 1–5% (Gew./Vol.) verwendet.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–18, dadurch gekennzeichnet, daß man die Inkubation in Gegenwart eines Salzes mit einem monovalenten Kation durchführt.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Salzkonzentration im Bereich von 0,5–1,5 M liegt.

21. Reagenzienkit zur Immobilisierung von Biopolymeren, umfassend

(a) Mittel zur Kopplung eines ersten Partners eines spezifischen Bindepaars an ein Biopolymer oder/und ein mit einem ersten Partner eines spezifischen Bindepaars gekoppeltes Biopolymer,

(b) eine Festphase, die den zweiten Partner des spezifischen Bindepaars an ihrer Oberfläche gebunden enthält und

(c) einen polymeren Immobilisierungsaktivator.

22. Reagenzienkit nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Biopolymer eine Nucleinsäure ist.

23. Reagenzienkit nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß das spezifische Bindepaar Biotin/Avidin bzw. Streptavidin ist.

24. Nucleinsäure, die über die nicht-kovalente Wechselwirkung zweier Partner eines spezifischen Bindepaars an einer Festphase immobilisiert ist, wobei der erste Partner des Bindepaars an die Nucleinsäure gekoppelt und der zweite Partner des Bindepaars an die Festphase gebunden ist, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäure eine Länge von mindestens 1 kb aufweist und in einer Konzentration von mindestens 1000 pmol pro cm² der Festphasenoberfläche immobilisiert ist.

25. Nucleinsäure, die über die nicht-kovalente Wechselwirkung zweier Partner eines spezifischen Bindepaars an einer Festphase immobilisiert ist, wobei der erste Partner des Bindepaars an die Nucleinsäure gekoppelt und der zweite Partner des Bindepaars an die Festphase gebunden ist, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäure eine Länge von mindestens 5 kb aufweist und in einer Konzentration von mindestens 300 pmol pro cm² der Festphasenoberfläche immobilisiert ist.

26. Nucleinsäure, die über die nicht-kovalente Wechselwirkung zweier Partner eines spezifischen Bindepaars an einer Festphase immobilisiert ist, wobei der erste Partner des Bindepaars an die Nucleinsäure gekoppelt und der zweite Partner des Bindepaars an die Festphase gebunden ist, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäure eine Länge von mindestens 10 kb aufweist und in einer Konzentration von mindestens 30 pmol pro cm² der Festphasenoberfläche immobilisiert ist.

27. Immobilisierte Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 24–26, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Partner des Bindepaars Biotin und der zweite Partner des Bindepaars Avidin oder/und Streptavidin ist.

28. Immobilisierte Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 24–27, dadurch gekennzeichnet, daß die Festphase Microbeads umfaßt.

29. Verwendung von immobilisierten Nucleinsäuren, die durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1–23 hergestellt wurden, oder von immobilisierten Nucleinsäuren nach einem der Ansprüche 24–28, zur Sequenzanalyse.

30. Verwendung von immobilisierten Nucleinsäuren, die durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1–23 hergestellt wurden, oder von immobilisierten Nucleinsäuren nach einem der Ansprüche 24–28, zur Untersuchung von Nucleinsäurebindenden Komponenten.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

Abb. 1

